

Tesis de Posgrado

Esporulación y crecimiento de algunas bacterias

Durieux, Juana E.

1948

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Química de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Durieux, Juana E. (1948). *Esporulación y crecimiento de algunas bacterias*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0551_Durieux.pdf

Cita tipo Chicago:

Durieux, Juana E. "Esporulación y crecimiento de algunas bacterias". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1948.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0551_Durieux.pdf

ESPORULACION Y CRECIMIENTO DE ALGUNAS BACTERIAS

FOR

JUANA E. DURIEUX

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTORA
EN QUIMICA EN LA FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FISICAS
Y NATURALES DE LA UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES.-

1948

Tesis 551

Al Doctor ALFREDO SORDELLI, cuyas constantes y eficaces indicaciones durante el transcurso del presente trabajo, me han sido ayuda valiosa para la feliz terminación del mismo, todo mi agradecimiento.

cuantitativamente la influencia de la concentración del O₂ en la germinación de las esporas, en el crecimiento vegetativo y en la formación de esporas. Los datos de Wund muestran diferencias interesantes entre las bacterias aerobias en lo que se refiere a la necesidad de O₂.

En general, la concentración mínima de O₂, para la germinación de esporas y para el crecimiento vegetativo (que es prácticamente la misma) es más baja que la concentración mínima para la producción de esporas.

En vista del hecho que la adición de glucosa al medio permite a muchas bacterias esporuladas crecer con concentraciones de O₂ mucho más bajas, es perfectamente posible que si la glucosa estuviera ausente del medio de cultivo la concentración mínima de O₂ obtenida por Wund, fuera distinta y probablemente más alta.

	O ₂ presente por litro;mg.		
	Mínimo	Optimo	Máximo
Germinación de esporas	4.3	70	1.336
Crecimiento vegetativo	4.3	60	1.336
Formación de esporas	6.8	276	1.336

Holzmueller (1909) estudiando la fisiología de 5 cepas de *Bacillus mycoides* encontró que el O₂ era esencial para la formación de esporas. Efectuó el experimento tomando muestras provenientes de un caldo de cultivo en el cual la producción de esporas no podía llevarse a cabo a causa de la concentración insuficiente de O₂; la observación la hizo microscópicamente en distintos intervalos de tiempo variando la concentración de O₂. El tiem

////

po requerido para la formación de esporas en las nuevas condiciones variaba inversamente con la edad del medio de cultivo.

Se descubrió asimismo que la producción de esporas, solo tenía lugar entre ciertas temperaturas. Se llegó a la conclusión de que para muchas y muy probablemente para todas las especies de bacterias esporuladas el intervalo de temperaturas para la producción de esporas es más estrecho que el que corresponde al crecimiento; o sea que el crecimiento puede tener lugar a temperaturas más altas o más bajas que las que limitan la esporulación. Estas temperaturas que limitan el crecimiento y la esporulación, varían no solamente con las especies pero también con la cepa o variedad de las bacterias esporuladas.

Schreider (1896) y mas tarde Gärtner (1903) llegaron a la conclusión importante que la adición de un carbohidrato retarda el crecimiento y la formación de esporas solo cuando el % de N aprovechable es escaso.

Itano y Neill (1918-19) encontraron que los límites de pH tanto para la germinación como para la producción de esporas se encontraban entre 7 y 8, mientras que para el crecimiento el pH está comprendido entre 4,2 y 9,4.

En la actualidad en lo único que concuerdan los investigadores es en lo que se refiere al intervalo de temperatura de incubación necesario para que se produzca el crecimiento y la esporulación y además en las condiciones óptimas para el crecimiento y la esporulación que son las mismas.

En el estudio de los demás factores que interesan en el mismo problema existe en general discordancia.

No está aún definitivamente demostrado el argumento

////

según el cual la formación de endosporas es debida ya sea al agotamiento del medio (Buchner 1890) o bien a la acumulación de productos secundarios del metabolismo (Lehmann 1888; Migula 1904).

Se observó que el % de esporas producidas por el B. mycoides en soluciones aereadas de peptona aumenta a medida que decrece la concentración de peptona y que lo contrario sucede con el B. fusiformis.

Brunstetter y Magoon (1932) llegaron a la conclusión de que tanto la concentración de productos del metabolismo, como la concentración de sustancias nutritivas eran de gran importancia en la determinación del % de esporas en el B. mycoides mientras que para el B. fusiformis "la acumulación de productos del metabolismo parece tener mucha más importancia que la concentración de sustancias nutritivas."

El trabajo de Cook (1931) según el cual el B. subtilis solo forma esporas en un intervalo de pH comprendido entre 6 y 7 fué refutado por Fabian y Bryan (1933) quienes observaron la esporulación de esa bacteria entre pH 5.0 y 7.5.

Williams (1929) fué incapaz de obtener esporas de B. subtilis en muchos medios sintéticos mientras Roberts (1934) halló 60 a 70% de endosporas de las mismas especies al cabo de 5 días en un medio sintético relativamente sencillo, usando como comparación una solución al 1% de peptona donde solo se observaba un 30% de esporas.

Los factores específicos esenciales, para permitir la esporulación de las bacterias son aún poco conocidas.

Hayward (1943) estudió el efecto que sobre la esporulación del B. subtilis tenían las siguientes sustancias: tiamina

ácido nicotínico, ácido pantoténico, riboflavina, piridoxina o biotina en un medio de hidrolizado de caseína libre de vitaminas, solo con el inositol se observó un débil estímulo en la producción de esporas.

En cuanto a las sustancias indispensables para el crecimiento de estas mismas bacterias, poco o nada se sabía hasta que Lochhead (1944) descubrió la necesidad de tiamina para el crecimiento del B. larvae.

Katznelson y Lochhead (1947) trabajaron con B. alvei y B. para alvei y trataron de determinar cuales eran las vitaminas y los amino ácidos necesarios para el crecimiento de esas bacterias.

Resultó indispensable la tiamina para el B. alvei tanto en un medio sintético como en uno a base de caseína hidrolizada; los amino ácidos indispensables son la glicina, cistina y la leucina.

Parecidas pero no idénticas, son las necesidades del B. para alvei ya que la tiamina actúa para su crecimiento como estimulante pero no como factor indispensable; como amino ácido la cistina resultó indispensable en los medios carentes de tiamina.

En cuanto a la propiedad de esporular, constituye parte del amplio y complejo problema de la disociación bacteriana y está perfectamente establecido que la esporulación está profundamente vinculada con la disociación bacteriana.

CAPITULO II

OBJETO DEL PRESENTE ESTUDIO

El presente trabajo se inició con la observación microscópica de un preparado teñido por el método de Gram de Lactobacillus casei cultivado en caldo de levadura glucosado.

Además de las formas típicas del Lactobacillus aparecieron en la observación microscópica bacterias Gram con tendencia a dar filamentos que al comienzo fueron confundidos con el Lactobacillus y que luego resultó ser una infección del cultivo.

Se aisló esta bacteria, sembrando material de ese caldo en cajas de agar extracto de carne, lo cual se consiguió satisfactoriamente, ya que en ese medio se produjo únicamente el crecimiento de lo que se consideraba una infección. Una nueva coloración de Gram de esa bacteria demostró que se trataba de una bacteria esporulada, la cual convenientemente estudiada resultó ser Bacillus subtilis.

Se consideró de interés estudiar el comportamiento del B. subtilis y de otras bacterias esporuladas en medios a base de levadura; tratar de establecer por qué motivo el B. subtilis no esporulaba o lo hacía tardíamente en esos medios; fraccionar el extracto de levadura por distintos disolventes y ver si se podía reproducir en una de las fracciones las propiedades observadas en el extracto de levadura total.

Este fué el primer problema que se presentó; pero desde un principio se encontró que de las varias bacterias en estudio pocas eran las que se comportaban en igual forma, a pesar de mostrar todas una diferencia marcada entre su conducta en el caldo de levadura y el caldo extracto de carne.

Fué así como al primitivo asunto de la esporulación, se añadió el problema del crecimiento y su inhibición siempre en medios a base de levadura.

Desde ya puede adelantarse que las principales diferencias en el comportamiento de las bacterias esporuladas se hallaron en la fracción de levadura extraída por alcohol, aún cuando no se ha llegado a determinar cuales eran las sustancias responsables de dicho comportamiento.

CAPITULO III

EL COMPORTAMIENTO DE VARIAS ESPECIES DE BACTERIAS

ESPORULADAS EN EL MEDIO DE LEVADURA.

Debido a la observación efectuada con el B. subtilis, según la cual se inhibía la esporulación de esta bacteria cuando se la cultivaba en un medio de levadura glucosada, se trató de ver si ese mismo fenómeno se repetía con otras bacterias esporuladas aerobias.

Se practicó el ensayo con las siguientes bacterias: B. cereus, B. mycoides, B. vulgatus, B. fusiformis, B. laterosporus, B. megatherium, B. simplex y B. subtilis.

El medio utilizado era agar extracto de levadura y la comparación se hizo con agar extracto de carne; ambos medios se ensayaron con y sin adición de glucosa.

Ya desde un principio fué posible establecer que el fenómeno no era general, pues ni el B. cereus ni el B. mycoides crecieron en los medios a base de levadura y la inhibición de la esporulación en las demás bacterias resultó ser menor que en el B. subtilis, el cual tardó mas tiempo en esporular; también él muestra una diferencia más marcada en su morfología cuando se la compara con la del extracto de carne. El B. laterosporus solo comenzó a desarrollar a las 86 hs.; en cuanto a la esporulación, se comporta como las demás bacterias de su género.

A pesar del diferente comportamiento de las bacterias esporuladas frente a los mismos agentes, en este caso el extracto de levadura, existe una similitud que consiste en la alteración en ese medio de algunas características importantes de estas bacterias, como son la esporulación y el crecimiento. Los ensayos sub-

siguientes han sido efectuados preferentemente con el B. subtilis en cuanto a la esporulación y con el B. cereus en lo que atañe al crecimiento.

CAPITULO IV

ESTUDIO DEL CRECIMIENTO Y ESPORULACION DEL BACILLUS SUBTILIS
EN MEDIOS SOLIDOS Y LIQUIDOS A BASE DE LEVADURA.

Debido a los resultados obtenidos en las experiencias anteriores, se trató de preparar un extracto de levadura que hiciera aparecer las diferencias más evidentes en el crecimiento y la esporulación de las bacterias en comparación con los medios comunes (extracto de carne) con la misma concentración de sustancias (determinadas por residuo seco).

Suponiendo que las condiciones según las cuales se efectúa la autólisis de la levadura tuvieran alguna influencia sobre las propiedades observadas en las bacterias esporuladas, se prepararon medios distintos variando el tiempo y la temperatura de autólisis.

Se autolizó la levadura a 37°, 24 hs. y a 50°, 24 hs. También se ensayó la autólisis durante 24 hs. a 37° seguida de otras 24 hs. a 50° y viceversa. Por cada uno de estos procedimientos se obtuvo un medio de cultivo diferente. Se ajusta el pH a 7.

En cuanto a la esterilización se usaron tres procedimientos: filtración por Seitz (F), esterilización simple (E) y doble (EE) con el fin de observar las posibles variaciones que cada uno de éstos métodos pudiera ocasionar. Se agregó estérilmente 2% de glucosa a cada uno de los tubos a utilizar y se hizo el ensayo en medio sólido y líquido.

El organismo utilizado es una cepa de B. subtilis. De un cultivo viejo del mismo en agar extracto de carne se hace un repique en otro tubo constituido por el mismo medio y se lo

incuba 24 hs. a 37°. A partir de ese cultivo se hace una suspensión en agua estéril y se toma un ansa de material de ese líquido para sembrar en cada uno de los tubos de la experiencia.

CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS DEL B. SUBTILIS

MEDIO	CRECIMIENTO			SUPERFICIE			CULTIVO COMO SEBO ESCURRIDO			GOTA DE ROCIO			SUPERFICIE HUMEDA			PIGMENTO		
	36hs	96hs	10ds	36hs	96hs	10ds	36hs	96hs	10ds	36hs	96hs	10ds	36hs	96hs	10ds	36hs	96hs	10ds
37º F	++++	++++	++++	R1	R+	no	no	no	G1	no	no	no	no	no	no	no	no	no
37º E	++++	++++	++++	R+	R+	si	no	no	G1	no	no	no	no	no	no	no	no	no
37º EE	++++	++++	++++	R2	R+	si	no	no	G1	no	no	no	no	no	no	no	no	no
50º F	++++	++++	++++	R3	R3	no	no	no	G4	no	no	no	no	no	no	no	no	no
50º E	++++	++++	++++	R4	R4	no	no	no	G4	G1	no	no	no	no	no	no	no	no
50º EE	++++	++++	++++	R4	R4	no	no	no	G4	G2	no	no	no	no	no	no	no	no
37º50ºF	++++	++++	++++	R4	R2	no	no	no	G1	G	no	no	no	no	no	no	no	no
37º50ºE	++++	++++	++++	R4	R4	no	no	no	G3	no	no	no	no	no	no	no	no	no
37º50ºEE	++++	++++	++++	R4	R4	no	no	no	G2	no	no	no	no	no	no	no	no	no
50º37ºF	++++	++++	++++	R4	R2	no	no	no	G1	no	no	no	no	no	no	no	no	no
50º37ºE	++++	++++	++++	R4	R3	no	no	no	G2	no	no	no	no	no	no	no	no	no
50º37ºEE	++++	++++	++++	R4	R3	no	no	no	G2	G	no	no	no	no	no	no	no	no
extracto carne	++++	++++	++++	LyU	LyU	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no

Grado de crecimiento: +, ++, +++
 Superficie (LyU = lisa y cultivo uniforme)
 (R = rugosa)
 Gota de rocío sobre la superficie = G
 Superficie húmeda = Sh

La observación de los cultivos, que se expone en el cuadro anterior, nos llevó a la conclusión de que convenía autolizar la levadura de cerveza preferentemente a 50° durante 24 hs. o bien hacer preceder o seguir este calentamiento por otro a 37°, pues era en esas condiciones que se obtenía con el extracto de levadura las diferencias mas apreciables con respecto al medio común de extracto de carne.

En cuanto a la esterilización, el método por filtración no demostró tener ninguna ventaja, sobre aquél por calentamiento en autoclave.

La experiencia en medio líquido, no merece la pena citar en extenso pues los resultados son comparables a los observados con el medio sólido.

Como característica diferencial interesante, en cuanto a su comparación con el caldo extracto de carne, es que la película presenta en el extracto de levadura una superficie muy rugosa cubierta de gotas de rocío que perduran aún después de 10 días de siembra.

CARACTERISTICAS INHERENTES A LA ESPORULACION

Conjuntamente con la observación morfológica de las colonias, se hicieron preparados coloreados de los mismos cultivos para comparar el porcentaje de esporas en uno y otro medio.

Los resultados variables que se obtienen de los preparados hechos a partir del medio líquido, en parte se deben a la extrema viscosidad de la película y a la dificultad de poder elegir las partes del cultivo de morfología parecida en los diferentes tubos, sobre todo en aquellos en los cuales la película está

cubierta por numerosas gotas de rocío. En los medios sólidos esta dificultad no se presenta pues debido a que el cultivo se extiende en una superficie mayor, resulta más fácil la elección de la muestra.

Aparte del reducido número de esporas que se observan en los medios de levadura, al examinar microscópicamente los preparados de B. subtilis, las formas vegetativas tienen una forma curiosa, pues además de observarse pequeños bastoncitos de extremos afinados, aislados o dispuestos de a par son frecuentes los bastones muy largos y delgados bastante curvados, tendiendo a la forma filamentosa que muestran ser mas Gram que los bastoncitos del mismo preparado.

COMPARACION DE LA ESPORULACION DEL B. SUBTILIS

EN MEDIOS SOLIDOS Y LIQUIDOS.

M E D I O	Porcentaje de esporas del B. subtilis					
	36 hs.		96 hs.		10 ds.	
	sol.liq.		sol.liq.		sol.liq.	
37º F	Eo	Eo	E ₂	E ₂	E ₃	E ₄
37º E	Eo	Eo	E ₂	E ₂	E ₃	E ₄
37º EE	Eo	Eo	E ₁	E ₂	E ₃	E ₄
50º F	Eo	Eo	E ₃	E ₅	E ₄	E ₅
50º E	Eo	Eo	E ₃	E ₅	E ₄	E ₆
50º EE	Eo	Eo	E ₃	E ₆	E ₅	E ₆
37º-50º F	Eo	Eo	E ₃	E ₅	E ₄	E ₆
37º-50º E	Eo	Eo	E ₃	E ₅	E ₅	E ₆
37º-50º EE	Eo	Eo	E ₃	E ₆	E ₅	E ₆
50º-37º F	Eo	Eo	E ₂	E ₆	E ₃	E ₆
50º-37º E	Eo	Eo	E ₂	E ₆	E ₃	E ₆
50º-37º EE	Eo	Eo	E ₂	E ₅	E ₃	E ₆
extracto carne	E ₃	E ₄	E ₁₀	E ₁₀	E ₁₀	E ₁₀

Eo = no esporas

E₁₀ = 100% de esporas

CARACTERISTICAS DE LA GOTA DE ROCIO Y DE LA SUPERFICIE

HUMEDA EN UNA COLORACION DE GRAM.

Observación de la gota de rocío. Gran número de bastones Gram débilmente teñidos; estas bacterias constituyen como un magma, tal como si hubiera una sustancia intercelular. También se ven bacterias Gram bien teñidas, sueltas, uniformemente distribuidas sobre el fondo de las bacterias Gram; rarísimas aparecen con una espora subterminal que apenas deforma la bacteria. El material para hacer el preparado se tomó con pipeta Pasteur.

Observación de la superficie húmeda del agar. Se ven al microscopio bastones Gram muy amontonados, sobre los cuales se observan bastones Gram sin esporular sueltos y muy fuertemente teñidos; el número de esporas que se forma es muy pequeño.

Tanto una como otra observación se hicieron partiendo de un cultivo de 10 días de inoculación en el extracto de levadura glucosado.

En base a esto, puede afirmarse que es en ésta parte del cultivo, donde el número de esporas es mínimo. Resulta lógico llegar a esta conclusión ya que de acuerdo con el cuadro I sólo se observa la aparición de una superficie húmeda en el agar, cuando ha existido anteriormente en ese lugar una gota de rocío motivo por el cual dicha superficie es considerada como una etapa posterior de aquella.

CAPITULO V

FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO DE LEVADURA. COMPORTAMIENTO DE
B. SUBTILIS Y B. CEREUS EN LAS DISTINTAS FRACCIONES.

Teniendo en cuenta que la composición del extracto de levadura es sin duda muy compleja, se resolvió fraccionarlo por tratamiento con disolventes orgánicos, para observar las diferencias de esporulación y crecimiento que se producen cultivando bacterias esporuladas en dichas fracciones.

El procedimiento usado es el siguiente: una cantidad conocida de extracto de levadura se seca por destilación al vacío (no mas de 50); una vez suficientemente seco el material, se extrae varias veces consecutivas por alcohol de 95° de modo que al final de las extracciones se haya utilizado una cantidad igual de alcohol que de extracto primitivo antes de la esporulación. El alcohol se deja en contacto durante 8 horas mas o menos en cada extracción, agitando de vez en cuando para que ésta se vea favorecida. Estas porciones de extracto alcohólico se reúnen y filtran por filtro plegado. El filtrado se destila al vacío evitando temperaturas muy altas (50°±). Tanto en este caso como en el anterior, se prefirió la destilación al vacío a temperatura baja, para evitar las posibles alteraciones por el calentamiento prolongado a temperaturas relativamente altas.

En el balón de destilación se obtiene un residuo blanco amarillento de olor "sui generis" que se disuelve en una cantidad conocida de agua.

Constituye el "extracto soluble" en alcohol. Se retida

ran de allí dos cc. de líquido para determinar el residuo seco.

El residuo insoluble en alcohol también se disuelve en una cantidad conocida de agua y se le determina asimismo el residuo seco.

(1) (extracto original secado (2)
Extracto acuoso secado) (sol. en alcohol(3)
(extracción alcohólica) (insol. en alcohol(4)

A partir del extracto soluble en alcohol se hicieron extracciones con otros disolventes (acetona, éter y alcohol metílico).

Una cantidad conocida de extracto soluble en alcohol y ya disuelta en agua se seca al vacío y el residuo se disuelve en igual cantidad de alcohol caliente. A partir de este líquido alcohólico se tomaron muestras para hacer las siguientes extracciones:

1 parte extracto alcohólico + 3 partes acetona (sol. acetona)
(insol. en ac.
Se obtiene un pp. abundante.

1 parte extracto alcohólico + 3 partes éter (sol. en éter)
(ins. en éter
Se obtiene un pp. abundante.

1 parte de extracto alcohólico + 3 partes de alcohol metílico; el extracto en alcohol etílico debilmente turbio se torna, al tratarse con alcohol metílico, totalmente limpido. De cada una de las porciones extraídas por los diferentes disolventes se determina el residuo seco.

En la experiencia siguiente, sólo se consignan los resultados obtenidos con la fracción alcohólica; los líquidos provenientes de las otras extracciones solo se utilizarán en una experiencia posterior.

Cada uno de los extractos (1),(2),(3) y (4) llevados a una concentración de residuo seco de 2,4%, constituyen las bases de los medios de cultivo para la siguiente experiencia. En cada uno de ellos es necesario controlar el pH y ajustarlo a 7; el extracto soluble en alcohol luego de la serie de operaciones a que ha sido sometido tiene un pH \approx 5; en tanto que los demás líquidos se conservan aproximadamente en pH 7.

Influencia sobre el desarrollo del cultivo.

Analizando los cuadros siguientes, llama la atención el comportamiento de las dos bacterias en estudio cultivadas en el extracto alcohólico de levadura; el B. subtilis frente a la es población y el B. cereus en cuanto al crecimiento.

En vista de que trabajando con una concentración al 2,4% de sustancia seca en el extracto alcohólico, no se observaba desarrollo del B. cereus se usaron concentraciones menores del mismo (1,2; 0,6; 0,3) para ver si de este modo era posible hacer desarrollar esa bacteria. En efecto al disminuir la concentración del medio, el crecimiento fué aumentando paulatinamente, aún cuando no llega a ser tan abundante como en los medios comunes de extracto de carne. Se supuso además que el agregado de una fuente hidrocarbonada a ese medio favorecería el crecimiento pero la experiencia demostró lo contrario; se usaron para ello concentracio nes decrecientes de glucosa.

Fué hecho también un ensayo análogo con los medios obtenidos por fraccionamiento acetónico y etéreo a partir del extracto alcohólico; el procedimiento empleado para preparar los me dios de cultivo a partir de esas fracciones, es exactamente el mis mo que el utilizado para trabajar con el extracto alcohólico o sea

que una vez determinado el residuo seco, se llevan los líquidos a la concentración deseada, en este caso 0,6% y 0,3% para poder comparar los resultados con los obtenidos en el extracto soluble en alcohol. Se trabaja a pH = 7 y para la siembra de las bacterias se utiliza el método explicado en páginas anteriores y que se adoptará exclusivamente para todas las experiencias subsiguientes.

Asimismo, se determinó el pH de cada uno de los medios al cabo de las 96 horas de inoculación. La temperatura de incubación de los cultivos es de 37°C, temperatura que se ha utilizado en todos los ensayos efectuados, razón por la cual se omitirá mencionar tal condición experimental en los ensayos que se expondrán a continuación.

CRECIMIENTO Y ESPORULACION DEL BACILLUS CEREUS

MEDIO	CRECIMIENTO Y MORFOLOGIA	Porcentaje de esporas al cabo de 24 horas 48 horas 60 horas 96 horas			
1) Extracto de levadura original	Aspecto butiroso; colonias grandes, poco diferenciadas. Superficie lisa. El desarrollo cubre toda la superficie.	no esporas	60% esporas	70% esporas	80% esporas
2) Extracto de levadura original separado	Igual que en el caso anterior.	no esporas	50% esporas	70% esporas	80% esporas
3) Extracto de levadura sol. en alcohol	No hay desarrollo.	-	-	-	-
4) Extracto de levad. ins. en alcohol	Semejante a (1)	20% esporas	50% esporas	80% esporas	90% esporas
5) 3 + 4	Crecimiento mas atenuado que en (1) y (2). Es tras nítidas en las cuales hay partes mas levantadas que otras, las cuales tienen una zona hundida en su centro. Aspecto butiroso.	no esporas	no esporas	5% esporas	2% esporas
6) Extracto de carne sim ple	Desarrollo común.	90% esporas	90% esporas	100% esporas	100% esporas
7) Extracto de carne tri ple	Parecido a (6) pero mas abundante.	90% esporas	90% esporas	100% esporas	100% esporas

////

CRECIMIENTO Y ESPORULACION DEL BACILLUS SUBTILIS

MEDIO	CRECIMIENTO Y MORFOLOGIA	Porcentaje de esporas al cabo de			
		24 horas	48 horas	60 horas	96 horas
1) Extracto de levadura original	Crecimiento en todo el medio; aspecto muy arrugado y plegado; gran cantidad de gotas de rocío.	no esporas	40% en esporangio. 10% sueltas	50% sueltas	60% sueltas
2) Extracto de levadura original secado	Semejante al anterior.	no esporas	40% en esporangio. 10% sueltas	50% sueltas	60% sueltas
3) Extracto de levadura soluble en alcohol	Aspecto muy peculiar; ni arrugado, ni plegado, colonias salteadas de tipo globuloso y color crema.	no esporas	no esporas	1% esporas	5% esporas
4) Extracto de levadura soluble en alcohol	Aspecto parecido a (2); más seco pero arrugado; gotas de rocío en menor número y más chicas.	20% esporas	70% esporas grandes	70% sueltas	80% sueltas
5) 3 + 4	Aspecto parecido a (2) y (3). Mucho menos plegado y arrugado; aún cuando mejor de ser liso, colonias opacas, las heyes aisladas; pocas gotas de rocío; parecen puntas de aguja.	no esporas	30% en esporangio	40%	50%
6) Agar extracto simple	Desarrollo común del agar extracto de carne.	80% esporas	80% esporas	90% esporas	100% esporas
7) Agar extracto triple	Parecido a (6) pero más abundante; superficie algo plegada.	60% esporas	70% esporas	80% esporas	100% esporas

De acuerdo con el cuadro adjunto se pueden hacer las siguientes deducciones:

1) El crecimiento del B. cereus en las fracciones insolubles en éter y acetona (2 y 5), se efectúa normalmente; la glucosa no altera su desarrollo.

2) El Bacillus cereus crece en forma mucho más limitada en las fracciones solubles en éter y acetona que en las respectivas insolubles.

3) La presencia de glucosa en esas fracciones tiene un efecto debilmente inhibitorio; éste se acentúa en forma muy marcada al utilizar como medio de cultivo las mezclas de los extractos solubles e insolubles respectivos en cantidades iguales (medios 3 y 6).

4) En el extracto soluble en alcohol (medio 7), a partir del cual se han obtenido las distintas fracciones que se acaban de analizar, la influencia de la glucosa, se observa en grado máximo.

5) La acidez, cuya producción hubiera podido ser un factor importante para explicar la inhibición del crecimiento del B. cereus, no nos permite a primera vista llegar a ninguna conclusión importante. Si bien el pH disminuye en los medios que han sufrido la adición de glucosa y en las fracciones solubles esta disminución va acompañada de una atenuación del crecimiento, este efecto es completamente nulo en las fracciones insolubles, por lo tanto la producción de ácido en los medios glucosados, podría ser considerada como una de las causas de la inhibición, pero no la única.

CRECIMIENTO DEL BACILLUS CEREUS EN DISTINTAS FRACCIONES DEL
EXTRACTO DE LEVADURA

M E D I O S	24 horas			96 horas		
	0.6%	0.3%	0.6%	pH	0.3%	pH
1) Sol. acetona + 0.1 glu.	±	+	+	6.6	++	6.6
" " + 0.05 "	±	+	+	6.4	++	6.6
" " sin "	++	++	++	7	++	6.8
2) Insol. acetona + 0.1 glu.	+++	++++	+++	6.2	++++	6.2
" " + 0.05 "	+++	++++	+++	6.4	++++	6.2
" " sin "	+++	++++	+++	8	++++	8
3) Sol. + insol. acet. + 0.1 glu.	±	+	±	6	++	6.0
" " " + 0.05 "	±	+	±	6.2	++	6.4
" " " sin "	++++	++++	++++	8.4	++++	8.4
4) Sol. éter + 0.1 glu.	++	+	++	7.0	+	7.0
" " + 0.05 "	++	+	++	7.0	+	7.0
" " sin "	++	+	++	7.4	+	7.4
5) Insol. éter + 0.1 glu.	+++	+++	++++	6.0	++++	6.2
" " + 0.05 "	+++	+++	++++	6.2	++++	6.0
" " sin "	++++	++++	++++	8.2	++++	8.2
6) Sol. + insol. éter + 0.1 glu.	±	±	+	6.2	+	6.2
" " " + 0.05 "	±	±	+	6.2	++	6.0
" " " sin "	++++	++++	++++	8.2	++++	8.4
7) Sol. alcohol + 0.1 glu.	±	±	+	6.2	+	6.4
" " + 0.05 "	±	±	+	6.4	+	6.4
" " sin "	+++	++++	++++	7.8	++++	8.4

Morfología de las bacterias en los medios precedentes

Para tener una información mas precisa, acerca del nuevo aspecto del Bacillus cereus, en los medios recientemente estudiados, se hizo un preparado de Gram, de cada uno de los cultivos al cabo de 48 hs. de inoculación.

El único hecho que se repite invariablemente en todas las observaciones es que la adición de glucosa al medio de cultivo, previene la formación de esporas; los medios que carecen de esta fuente hidrocarbonada, muestran un porcentaje muy grande de bacterias esporuladas; en cuanto a la tinción de las bacterias, es muy irregular, notándose indistintamente, bastones Gram⁺ y Gram⁻.

Examen del número de bacterias viables de los cultivos anteriores y de las posibles variaciones inducidas

Como el cultivo en los medios anteriores, fué juzgado por la turbidez, se consideró conveniente averiguar si existía asociación, entre dicha turbidez, como signo del número de bacterias presentes y el número de colonias que se formaban, sembrando igual cantidad de cada uno de los cultivos en agar extracto de carne. Asimismo, se intentó dicho experimento para saber si el cultivo en los medios mencionados anteriormente, había inducido alguna variación que se tradujera en el cambio de morfología de las colonias.

Los resultados expuestos en el cuadro, revelan que existe correlación entre turbidez y número de colonias desarrolladas y que por lo tanto no existe ningún fenómeno digno de mención y que diferencie el cultivo de estas bacterias en los medios estudiados, de los medios comunes.

La variación morfológica principal, fué observada en

los medios con glucosa.

Las colonias presentan un centro transparente irregular; un anillo opaco y alrededor una corona transparente y chata; aspecto muy diferente del observado en cultivos provenientes de medios comunes.

CRECIMIENTO DEL B. CEREUS EN DIFERENTES FRACCIONES DEL
EXTRACTO DE LEVADURA. INFLUENCIA DE LA GLUCOSA

M E D I O S	0.6 %		0.3 %	
	Desarrollo	Tamaño de las colonias	Desarrollo	Tamaño de las colonias
1) Sol.acet.+0.1 glu.	+	m.grandes	+	m.grandes
" " +0.05 "	++	medias	+	m.grandes
" " sin "	++++	pequeñas	++++	medias
2) Ins.acet.+0.1 glu.	++	grandes	++	medias
" " +0.05 "	++	grandes	++	grandes
" " sin "	++++	m.pequeñas	++++	m.pequeñas
3) Sol.in.ac+0.1 glu.	+	grandes	++	medias
" " " +0.05 "	+	grandes	++	medias
" " "sin "	+++	medias	++++	pequeñas
4) Sol.éter +0.1 glu.	+	grandes	++	medias
" " +0.05 "	+	grandes	++	medias
" " sin "	++++	pequeñas	++++	pequeñas
5) Ins.éter +0.1 glu.	++	grandes	++	medias
" " +0.05 "	+	m.grandes	+++	pequeñas
" " sin "	+++	pequeñas	++++	pequeñas
6) Sol.in.et+0.1 glu.	+	grandes	+	grandes
" " " +0.05 "	+	grandes	+	grandes
" " "sin "	+++	pequeñas	++++	pequeñas
7) Sol.alcoh+0.1 glu.	+	grandes	+	grandes
" " +0.05 "	+	grandes	+	grandes
" " sin "	++++	pequeñas	++++	pequeñas

CAPITULO VI

COMPARACION DEL CULTIVO DE BACTERIAS ESPORULADAS Y NO
ESPORULADAS EN MEDIOS A BASE DE EXTRACTO DE LEVADURA

En vista de los resultados obtenidos al estudiar el crecimiento del Bacillus subtilis y del Bacillus cereus en medio de extracto de levadura, se ensayó el crecimiento en esos mismos medios o en otros levemente modificados de un mayor número de bacterias esporuladas aerobias y asimismo el de bacterias no esporuladas que tenían como característica común con aquellas su comportamiento aerobio y su desarrollo en caldo común peptonado (3 gramos de extracto de carne; 5 gramos de peptona; 1.000 de agua).

Para tener una información más completa se trabajó en medios con y sin glucosa. Las concentraciones de todos los medios corresponden a 2,4% de residuo seco.

Del exámen del cuadro siguiente se deduce que las bacterias no esporuladas crecen en los extractos de levadura (extracto total, partes soluble e insoluble) con la misma profusión que en el extracto de carne peptonado. Los esporulados en cambio revelan en varios casos una diferencia apreciable de crecimiento en la fracción soluble en alcohol del extracto de levadura, siendo el B. cereus el que mayor diferencia presenta pues no muestra ningún crecimiento. El B. subtilis y el B. fusiformis y en mucho menor grado el B. mycoides tienen un comportamiento semejante, en cambio los Bacillus vulgatus y laterosporus, apenas revelan diferencia con el extracto de carne peptonado.

La adición de glucosa, en general no produce cambios

muy marcados cuando se compara el extracto de levadura total o la parte insoluble del mismo del caldo extracto peptonado. Por el contrario en la fracción del extracto de levadura, se observan diferencias marcadas. Prácticamente todos los esporulados, apenas crecen o no crecen, mientras los no esporulados crecen relativamente bien, con excepción del enterococo y de la Serratia marcescens que los hacen en menor grado que en el extracto de carne peptonado adicionado de glucosa.

CAPITULO VII

INFLUENCIA DE DISTINTOS AZUCARES Y OTRAS SUS-
TANCIAS EN EL CRECIMIENTO DE LAS BACTERIAS ESPORULADAS

Habiéndose observado la inhibición expresada antes en el crecimiento de las bacterias esporuladas, por el agregado de glucosa al extracto soluble en alcohol, se ensayó el efecto de la adición al medio de otros cuerpos hidrocarbonados, como ser: sacarosa, lactosa, galactosa, xilosa, ácido láctico, ácido cítrico y glicerina.

El extracto soluble se utiliza, en una concentración de residuo de 0,6%, en el cual el Bacillus cereus y el Bacillus subtilis crecen en forma abundante sin el agregado de sustancias extrañas al medio.

El mismo experimento, se hizo en caldo extracto de carne, de igual concentración (0,6%) que la fracción de levadura soluble en alcohol.

CRECIMIENTO DEL B. SUBTILIS Y DEL B. CEREUS EN EL EXTRAC-
TO SOLUBLE EN ALCOHOL POR ADICION DE DISTINTAS SUSTANCIAS

Experiencia I

A D I C I O N	B. SUBTILIS		B. CEREUS	
	Caldo	Ext.sol.	Caldo	Ext.sol.
0	+++	+++	+++	+++
glucosa 2%	+++	0	+++	0
galactosa 2%	+++	0	+++	0
sacarosa 2%	+++	+++	+++	+++
lactosa 2%	+++	+++	+++	+++
xilosa 2%	+++	0	+++	0
a. cítrico 2%	+++	++	+++	+++
glicerina 2%	+++	+++	+++	+++
a. láctico 2%	+	0	+	0

Experiencia II

A D I C I O N	2 . 4 %		1 . 2 %		0 . 6 %		0 . 3 %	
	Subt.	Cereus	Subt.	Cereus	Subt.	Cereus	Subt.	Cereus
0	0	0	++	0	+++P	+++	++++P	++++
glucosa 1%	0	0	+	0	++	0	++	0
" 0.1%	0	0	+	0	++	±	++	±
" 0.05%	0	0	+	0	++	±	+++	±
" 0.02%	0	0	+	0	++	±	+++	±
" 0.01%	0	0	+	0	++	±	+++	±
a. láctico 1%	0	0	0	0	0	0	0	0
" " 0.1%	0	0	0	0	0	0	0	0
" " 0.05%	0	0	0	0	0	0	0	0
" " 0.02%	0	0	+	0	++P	++	++P	+++
" " 0.01%	0	0	++P	0	++F	++	++P	+++
sacarosa 1%	0	0	++	0	+++	+++	++++P	++++
" 0.1%	0	0	++	0	+++	+++	++++P	++++
" 0.05%	0	0	+++	0	+++	+++	++++P	++++
" 0.02%	0	0	+++P	0	+++P	+++	++++P	++++
" 0.01%	0	0	+++P	0	+++P	+++	++++P	++++
lactosa 1%	0	0	+++	++	+++	+++	++++P	++++
" 0.1%	0	0	+++	++	+++	+++	++++P	++++
" 0.05%	0	0	+++	++	+++	+++	++++P	++++
" 0.02%	0	0	+++	++	+++	+++	++++P	++++
" 0.01%	0	0	+++	++	+++	+++	++++P	++++
a. cítrico 1%	0	0	++	+++	+++	++++	++++	++++
" " 0.1%	0	0	++	+++	+++	++++	++++	++++
" " 0.05%	0	0	+++	+++	+++	++++	++++	++++
" " 0.02%	0	0	+++	+++	+++	++++	++++	++++
" " 0.01%	0	0	+++	+++	+++	++++	++++	++++
glicerina 1%	0	0	+	0	++	+++	++	++++
" 0.1%	0	0	+	0	++	+++	+++	++++
" 0.05%	0	0	+	0	++	+++	+++	++++
" 0.02%	0	0	++	0	++	+++	+++	++++
" 0.01%	0	0	++	0	++	+++	+++	++++

P = película

Teniendo en cuenta los resultados del experimento anterior y con el propósito de ampliar nuestros conocimientos acerca de esta cuestión, se utilizaron las mismas sustancias en proporciones decrecientes, obteniéndose los resultados que se consignan en los cuadros II y III. En todos los medios, se ha llevado su pH a 7, utilizando OHNa n y N/10 y un indicador común.

Las observaciones fueron hechas a las 48 horas de siembra. En un mismo cuadro se han expuesto los resultados obtenidos con el Bacillus subtilis y el B. cereus, para poder apreciar más fácilmente, las similitudes y diferencias de comportamiento de estas dos bacterias en esos medios.

Analizando los cuadros, hacemos las siguientes deducciones:

1) Con concentraciones altas (2,4%) de residuo en el extracto soluble no se observa crecimiento de ninguna de las dos bacterias esporuladas como fuera observado otras veces.

2) Disminuyendo la concentración a 1,2%, comienza a crecer el B. subtilis y sólo cuando se reduce al 0,6% el B. cereus muestra desarrollo, este aumenta en un extracto soluble cuya concentración es la mitad de la anterior.

Estas consideraciones se refieren al medio que no ha sufrido el agregado de ninguna sustancia extraña.

Pasando ya a los medios que contienen azúcares u otra sustancia hidrocarbonada concluimos lo siguiente:

1) La glucosa es el hidrato de carbono, que produce un efecto inhibitorio mas marcado en el crecimiento de ambas bacterias esporuladas; pero este efecto se pone aún mas en evi-

dencia con el B. cereus.

2) Los otros azúcares tienen un comportamiento variado y en general no producen inhibición muy acentuada sobre el crecimiento de estas bacterias. Algunos disacáridos, como la lactosa y otras sustancias hidrocarbonadas como el ácido cítrico, favorecen el desarrollo de estas bacterias; la glicerina produce una débil inhibición.

Experiencia III

A D I C I O N	2 . 4 %		1 . 2 %		0 . 6 %		0 . 3 %	
	E.coli	S.marc	E.coli	S.marc	E.coli	S.marc	E.coli	S.marc
0	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++
glucosa 1%	++++	+++	+++	+++	+++	++	++	++
" 0.1%	++++	+++	+++	+++	++	++	++	++
" 0.05%	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++
" 0.02%	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++
" 0.01%	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++
a. láctico 1%	++	++	++	++	++	++	++	++
" " 0.1%	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++
" " 0.05%	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++
" " 0.02%	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++
" " 0.01%	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++
sacarosa 1%	++++	+++	+++	+++	++	+++	++	+++
" 0.1%	++++	+++	+++	+++	++	+++	++	++
" 0.05%	++++	+++	+++	+++	++	++	++	++
" 0.02%	++++	+++	+++	+++	++	++	++	++
" 0.01%	++++	+++	+++	+++	++	++	++	++
lactosa 1%	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
" 0.1%	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++
" 0.05%	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++
" 0.02%	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++
" 0.01%	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++
a. cítrico 1%	++++	++++	++++	++++	+++	+++	++	+++
" " 0.1%	++++	++++	+++	+++	++	+++	++	++
" " 0.05%	++++	+++	+++	+++	++	++	++	++
" " 0.02%	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++
" " 0.01%	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++
glicerina 1%	++++	+++	++++	+++	+++	++	++	++
" 0.1%	++++	+++	+++	+++	++	++	++	++
" 0.05%	++++	+++	+++	+++	++	++	++	++
" 0.02%	++++	+++	+++	+++	++	++	++	++
" 0.01%	++++	+++	+++	+++	++	++	++	++

3) El hecho que nos llama la atención es el de la influencia inhibitoria producida por el ácido láctico (Lactato de sodio).

La experiencia que se comentó, fué acompañada de otra, en la cual utilizando los mismos medios de cultivo y las mismas sustancias, se ensayó el efecto sobre el crecimiento de dos bacterias no esporuladas: Escherichia coli y Serratia marcescens.

Poco o nada varía el comportamiento de estas bacterias en esos medios; en cuanto al fenómeno de inhibición, solo el ácido láctico muestra una débil influencia.

Podemos apreciar facilmente en los cuadros precedentes aquellos que ya se dijo en capítulos anteriores o sea que si bien una disminución de la concentración del extracto favorece el desarrollo de las bacterias esporuladas, el efecto opuesto se produce con las no esporuladas.

CAPITULO VIII

IMPORTANCIA DE LA EDAD DEL CULTIVO EN LOS FENOMENOS

OBSERVADOS

Algunos experimentos contradictorios nos indujeron a investigar si los hechos observados pudieron haber sido debidos a diferencias del material sembrado.

En general las experiencias en las cuales aparecía inhibido el crecimiento, fueron efectuadas con bacterias esporuladas de 24 horas de siembra, y de acuerdo con la idea mencionada, se hizo una experiencia utilizando cultivos viejos (10 días), para ver si la edad de los mismos, pudiera tener influencia sobre el fenómeno en estudio. El ensayo se efectuó con el Bacillus subtilis y el B. cereus.

Al mismo tiempo se hizo otra experiencia empleando cultivos de 24 horas de las mismas bacterias.

No se trabajó solamente con un extracto alcohólico, sino con tres obtenidos a partir de distintos extractos de levadura.

La observación del cuadro siguiente demuestra que con cultivos jóvenes, el fenómeno de inhibición en presencia de glucosa es más evidente, sobre todo tratándose del Bacillus subtilis; no obstante el B. cereus presenta aún una marcada inhibición del crecimiento cuando se emplean cultivos viejos.

Esta misma experiencia, nos sirve para demostrar la dificultad de reproducir los mismos resultados con cualquier extracto alcohólico, pues aún cuando la inhibición es manifiesta, los fenómenos observados no concuerdan exactamente en los tres medios de cultivo.

INFLUENCIA DE LA EDAD DEL CULTIVO DE SIEMBRA SOBRE
EL CRECIMIENTO DE B. SUBTILIS Y B. CEREUS

MEDIOS DE CULTIVO	BACILLUS CEREUS		BACILLUS SUBTILIS					
	Cult. viej.		Cult. jov.		Cult. viej.		Cult. jov.	
	0.6%	0.3%	0.6%	0.3%	0.6%	0.3%	0.6%	0.3%
Ext.alcoh.1+0.1 glu.	+	+	0	±	+++	+++	+	+
" " "+0.05 "	+	+	0	+	+++	+++	+	++
" " "+0.02 "	+	+	+	+	+++	+++	+++	+++
" " "+0.01 "	+	+	+	+	+++	++++	+++	+++
" " "sin "	++++	++++	+++	+++	++++P	++++P	++++P	++++P
Ext.alcoh.2+0.1 glu.	+	±	0	0	++	+++	+	+
" " "+0.05 "	+	+	0	±	++	+++	+	++
" " "+0.02 "	+	+	0	±	++	+++	++	++
" " "+0.01 "	+	+	0	±	++	+++	++	+++
" " "sin "	++++	++++	++++	++++	++++P	++++P	++++P	++++P
Ext.alcoh.3+0.1 glu.	±	±	±	+	++	+++	+	+
" " "+0.05 "	±	±	±	+	++	+++	++	+
" " "+0.02 "	+	±	±	+	+++	+++	++	++
" " "+0.01 "	+	±	±	+	+++	+++	++	++
" " "sin "	+++	++++	++	++	++++P	++++P	++++P	++++P

P = película

Grado de crecimiento) ± = muy escaso
(+ = escaso
(++ y +++ = mediano
(++++ = abundante

Las observaciones fueron hechas a las 48 horas..

CAPITULO IX

EL FENOMENO DE INHIBICION DEL CULTIVO

La inhibición del cultivo observada en el curso de este estudio, constituye un fenómeno interesante cuyo mecanismo merece ser aclarado.

a) La literatura contiene la referencia de hechos que guardan alguna analogía y que creemos conveniente referir para ilustrar mejor, los hallazgos hechos por nosotros.

En verdad la inhibición del cultivo de las bacterias en medios favorables para su desarrollo es un hecho conocido desde el descubrimiento de las sustancias antisépticas; la explicación del mecanismo de éste fenómeno no ha sido dada de manera satisfactoria.

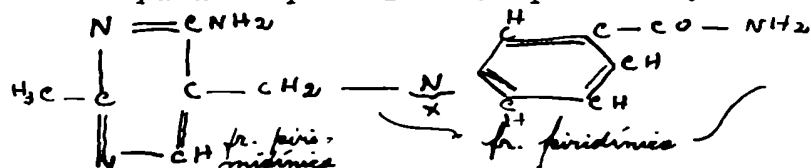
Desde que se conoció la constitución química de sustancias biológicamente activas (principalmente vitaminas y aminoácidos) se investigaron las exigencias nutritivas de las bacterias con respecto a las sustancias antes mencionadas.

Aparte del interés que encierra el conocimiento de dichas exigencias nutritivas en vitaminas u otras sustancias por ciertas bacterias, se ha podido establecer que cuerpos de naturaleza semejante a la de la sustancia necesaria para su crecimiento pueden actuar de dos maneras, ya como precursores de la sustancia esencial en el metabolismo o de modo tal que interfiere con el factor indispensable del crecimiento y éste se inhibe.

Los ejemplos siguientes pueden servir de ilustración.

Tiamina: Esta sustancia es necesaria para el desarrollo del *Staphylococcus aureus*. Si a los medios de cultivo que contienen tiamina, se les agrega piritiamina, se observa una inhibición en el crecimiento de la bacteria.

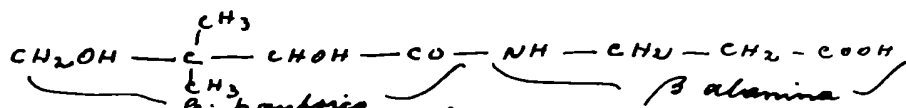
La diferencia estructural, entre una y otra sustancia consiste en que en la piritiamina, el anillo del tiazol de la tiamina está reemplazado por el de la piridina.



El índice de inhibición de la piritiamina para el *S. aureus* es de 2.000, este índice indica los g de piritiamina necesarios para reducir a la mitad el crecimiento, máximo que se obtiene por una concentración de 0,01 g de tiamina por ml. en el medio.

La análoga constitución de la tiamina y piritiamina puede servir de fundamento a una interpretación plausible del fenómeno. Bastaría admitir que la segunda desplaza a la tiamina en algún sistema en que ésta es indispensable y el producto que ella forma no sirve para satisfacer el normal desarrollo de la bacteria.

Acido pantoténico. Es este un factor esencial para el crecimiento de la generalidad de las bacterias lácticas.



Se considera constituido por dos porciones: el ácido pantoico y la alanina. La especificidad de la porción nitrogenada (alanina) es mayor que la de la otra; las condensaciones de la lactona de ácido pantoico con alanina, ácido amino butírico, ácido aspártico y lisina en lugar de la alanina, producen sustancias biológicamente inactivas. La condensación de la alanina con diferentes hidroxilácidos produce sustancias de actividad inhibitoria muy reducida, comparada con los productos obtenidos por reemplazo de la fracción nitrogenada.

Entre las causas de este comportamiento figura el bloqueo de sistemas enzimáticos que utilizan el ácido pantoténico, los cuales son esenciales para la vida de los microorganismos.

Biotina: Existe en la clara de huevo una sustancia que actúa como antagonista de la biotina. Se ha demostrado que es una proteína que tiene algunas características de las albúminas y que puede combinarse estequiométricamente con la biotina. Se propuso para esa sustancia el nombre de "avidina".

Es de acción inhibitoria evidente, sobre las siguientes bacterias, para las cuales la biotina es un factor esencial de crecimiento: Cl. butylicum casei; L. arabinosus; Str. lactis. Agregando un exceso de biotina al medio queda anulada esta acción inhibitoria.

Solo hay inhibición del crecimiento cuando se trate de bacterias que necesitan un suministro exterior de la vitamina o sea que la avidina solo se combinaría con la biotina que se agrega al medio y parece no poder penetrar a aquellos lugares donde se produce la síntesis de la biotina.

Acido p-aminobenzoico: Las sustancias derivadas de este compuesto que tienen una acción inhibitoria máxima, son los compuestos sulfanílicos.

Cabe señalar aquí que fué buscando sustancias que actuaran como antagónicas de los derivados sulfanílicos que se descubrió la necesidad del ácido p-aminobenzoico como factor esencial del crecimiento de ciertas bacterias entre las que figura el Streptococcus hemolyticus.

Siendo la concentración inhibitoria de la sulfanilamida sobre esa bacteria de 3.03×10^{-4} M; paralización de la actividad

de la sulfamida por el ácido P.A.B. se consigue con $1.2-5,8 \times 10^{-6} M$.

Se buscaron otros derivados no sulfanilados que inhibieran el crecimiento de bacterias y cuya acción fuera antagónica del ácido p-a-b pero a pesar de haberse hallado muchos, ninguno de ellos produce efectos tan marcados como los de los derivados sulfanílicos. La interpretación del fenómeno de inhibición es semejante a la mencionada para las vitaminas anteriores.

Acido nicotínico y nicotinamida



En el caso de esta vitamina son los derivados sulfonados los que producen la inhibición del crecimiento (piridin-3 sulfónico)

Todas las inhibiciones producidas por la piridin-3 sulfónico y su amida son anuladas específicamente por el ácido nicotínico o derivados muy próximos. En este caso presenta analogías con el del P.A.B. y las sulfamidas, pues el grupo sulfónico o el de su amida reemplaza al grupo carboxilo del ácido nicotínico, tal como el grupo amido sulfónico reemplaza el grupo carboxilo del P. A.B.

La acción de estas sustancias es bien evidente sobre el Proteus vulgaris y el Staphylococcus aureus que requieren para su crecimiento una fuente externa del ácido nicotínico; la inhibición es menos evidente si se usa como factor esencial la amida nicotínica.

Mucho se ha investigado hasta el presente acerca de las concentraciones óptimas de diferentes vitaminas para permitir o estimular el crecimiento de los microorganismos, pero poco se

sabe con respecto a la acción inhibitoria producida por concentraciones altas de las mismas.

Utilizando el ácido nicotínico se han llegado a obtener resultados interesantes. Las bacterias con las que se trabajó no tenían las mismas exigencias en cuanto a esta vitamina; para unas era indispensable un suministro externo de la misma, en tanto que otras podían sintetizarla.

Aún cuando los resultados son en términos generales semejantes no se los puede repetir en forma idéntica. Por ej. el B. megatherium crecía poco en presencia de 1.000 a 3.000 g por ml. de ácido nicotínico o de su amida; sin embargo aún cuando los métodos empleados fueron iguales no fué posible en otros casos hacer crecer la bacteria en presencia de 1.000 g.

Las bacterias esporuladas que se emplearon (B. subtilis; B. vulgaris; B. megatherium) revelaron una inhibición mas marcada que cualquier otra bacteria. Los resultados varían según el medio basal empleado, pero es preferible trabajar con medios sencillos; con los medios que contienen caseína hidrolizada se observa, frente a cantidades considerables de ácido nicotínico, una inhibición mucho menos marcada.

0,1% de extracto de levadura, o sea 1.000 g del material seco por ml. anulan completamente la inhibición causada por 10.000 g de ácido nicotínico; naturalmente este efecto de protección del extracto de levadura se atenúa progresivamente al disminuir su concentración.

Estos hechos pueden servir en cierto modo, como de punto de referencia para intentar una explicación del mecanismo del fenómeno de inhibición que hemos descripto.

Por razones de tiempo y de dificultades experimentales no lo hemos podido realizar.

Un intento rudimentario de aclaración del mecanismo de inhibición fué llevado a cabo investigando como interfiere el extracto alcohólico en el crecimiento del B. cereus cultivado en un medio de composición sencilla.

Se eligió como medio de cultivo el de Proskauer y Beck (citrato de amonio, sulfato), por su constitución sencilla. Su fórmula es la siguiente:

Agua destilada	1.000 cc.
SO ₄ (NH ₄) ₂	3 g .
Acido cítrico	2 g .
SO ₄ Mg	2 g .
Fosfato monopotásico	5 g .

Se disuelven todas las sustancias de la fórmula anterior en agua; se ajusta el pH a 7. Se agrega 1% de cualquiera de las fuentes de carbono siguientes:

glucosa	maltosa
lactosa	sacarosa

Para la presente experiencia se ha utilizado glucosa. De este modo los resultados pueden ser comparados mas facilmente con los de las experiencias precedentes.

La experiencia fué planeada y realizada en la forma que se puede apreciar facilmente en el cuadro que sigue. El objeto que se ha perseguido en dichas experiencias es el de averiguar si las condiciones que determinan el metabolismo del B. cereus en el medio sintético predominan sobre las del medio de extracto de

levadura o a la inversa.

Quedaría por investigar si variando las concentraciones relativas de los medios se hubieran observado resultados distintos de los que aparecen en el cuadro.

Cada uno de los líquidos usados ha sido esterilizado por separado y las mezclas fueron hechas estérilmente.

INFLUENCIA DE LA ADICION AL MEDIO SINTETICO, DE LA FRACCION SOLUBLE EN ALCOHOL DEL EXTRACTO DE LEVADURA EN EL CRECIMIENTO DEL

B. CEREUS

M E D I O S					CRECIMIENTO DEL BACILLUS CEREUS al cabo de 48 horas
Ext. lev. sol. alc. 0.6%	0.3%	Medio Sintét.	H ₂ O	Glucosa 10%	
-	-	0.5 cc	0.5 cc	0.1 cc	++++
-	-	0.5 cc	0.5 cc	0.05 cc	+++
-	-	0.5 cc	0.5 cc	0.02 cc	++
-	-	0.5 cc	0.5 cc	0	+
0.5 cc	-	0.5 cc	-	0.1 cc	+
0.5 cc	-	0.5 cc	-	0.05 cc	+
0.5 cc	-	0.5 cc	-	0.02 cc	++
0.5 cc	-	0.5 cc	-	0.1 cc	++++
0.5 cc	-	-	0.5 cc	0.1 cc	0
0.5 cc	-	-	0.5 cc	0.05 cc	0
0.5 cc	-	-	0.5 cc	0.02 cc	+
0.5 cc	-	-	0.5 cc	0	++++
-	0.5 cc	0.5 cc	-	0.1 cc	+
-	0.5 cc	0.5 cc	-	0.05 cc	+
-	0.5 cc	0.5 cc	-	0.02 cc	++
-	0.5 cc	0.5 cc	-	0	++++
-	0.5 cc	-	0.5 cc	0.1 cc	+
-	0.5 cc	-	0.5 cc	0.05 cc	+
-	0.5 cc	-	0.5 cc	0.02 cc	+
-	0.5 cc	-	0.5 cc	0	++++

Se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1) El B. cereus crece bien en el medio sintético y en proporción del contenido de glucosa. En ausencia de éste el crecimiento es muy escaso.

2) En el medio de extracto de levadura soluble en alcohol el crecimiento revela igual comportamiento que en experiencias anteriores, esto es que la glucosa inhibe el crecimiento tanto mas, cuanto mas concentrada.

3) En la mezcla de los dos medios de cultivo, el crecimiento revela un comportamiento análogo al observado en el medio sintético, esto es que la glucosa inhibe tanto mas el crecimiento, tanto mas concentrada.

De esto resulta evidente que el metabolismo dominante, en presencia de los dos medios es el que corresponde al del extracto de levadura soluble en alcohol.

CAPITULO X

CONSIDERACIONES SOBRE LA POSIBLE CONSTITUCION DEL MEDIO

Las experiencias acerca del crecimiento y esporulación efectuadas en las distintas fracciones del extracto de levadura y en particular los resultados obtenidos en la fracción soluble en alcohol llevaron nuestro interés a buscar la composición posible de este último medio.

No se ha podido llegar sino a resultados provisorios, en parte por la complejidad del medio y también por la falta de reacciones suficientemente específicas que evidencien la presencia de pequeñas cantidades de las varias sustancias presentes.

Por tres caminos hemos procurado tener un conocimiento aproximado del problema que nos ocupa; 1º) la solubilidad de las sustancias, 2º) las reacciones químicas y 3º) el crecimiento del *Lactobacillus casei* en ese medio.

La producción industrial de levadura de cerveza, o prensada para el uso en la panificación, ha inducido el desarrollo de otros usos de la levadura y especialmente en la alimentación y en la industria de las preparaciones farmacéuticas vitamínicas. Los extractos de levadura son producidos industrialmente y de algunos de ellos se conoce su constitución.

Aún cuando no todos los autolizados de levadura de cerveza, tengan la misma composición, pues ésta depende entre otras cosas, del tiempo y de la temperatura de autólisis, puede servirnos de orientación para nuestro propósito, el análisis que va a continuación que es el de una levadura de cerveza autolizada, producida por una firma americana de (U.S.A.)

El análisis químico de esta levadura revela la siguiente
composición

	<u>Polvo</u>
Sólidos	96,00 %
Nitrógeno total	11.50
Nitrógeno aminado (Van Slyke)	6.50
Amina (% del nitrógeno total)	57.00
Nitrógeno de peptonas	2.00
Nitrógeno de proteosas	0.50
Nitrógeno de polopéptidos, purinas, pirimidinas y amidas (por diferencia)	2.50
Carbohidratos por diferencia	13.10
Sustancias reductoras	rastros
Sustancias extraíbles por éter	1.50
Cenizas totales	10.00
Cloruro de Na	0.50

Análisis de las cenizas

K ₂ O	40.10 %
P ₂ O ₅	25.25
Al ₂ O ₃	14.76
Fe ₂ O ₃	2.69
MgO	1.17
CaO	0.35
SiO ₂	2.98

Composición aproximada en los principales cuerpos

K ₂ HPO ₄	61.90 %
---------------------------------	---------

K ₂ S ₀₄	12.37
NaCl	3.74

Amino ácidos calculados en base a 16% de Nitrógeno

Arginina	3.5 %
Histidina	1.5 %
Lisina	6.5 %
Tirosina	4.0 %
Triptófano	1.0 %
Fenilalanina	3.5 %
Cistina	1.6 %
Metionina	2.0 %
Treonina	3.3 %
Leucina	6.4 %
Isoleucina	4.7 %
Valina	4.8 %

Contenido de vitaminas y otras sustancias

	Proporción en 100 gs.
Tiamina	2.0 mg.
Riboflavina	4.0 mg.
Niacina	20.0 mg.
Acido pantoténico	10.0 mg.
Piridoxina	1.5 mg.
Biotina	0.2 mg.
Acido fólico	0.8 mg.
Colina	200.0 mg.

Probablemente haya también diferencias entre los autolizados preparados a partir de diferentes cepas de levadura y de cepas de conservación en condiciones diferentes.

Los cuadros que anteceden permiten tener una idea de cual puede ser la constitución del extracto de levadura total obtenido por autólysis y usados en nuestros experimentos. Las sustancias del extracto soluble en alcohol deben encontrarse entre los mencionados en dichos cuadros.

1) LA SOLUBILIDAD DE LAS SUSTANCIAS

En cuanto a la composición de la fracción soluble en alcohol que es la que mejor ha revelado las diferencias de comportamiento de las bacterias esporuladas, se pueden preveer sus posibles constituyentes con el conocimiento de la solubilidad en alcohol de los cuerpos mencionados en el análisis del cuadro anterior.

A continuación figura esta propiedad para las vitaminas, polipéptidos, amino ácidos y las bases purínicas y pirimidínicas.

VITAMINAS

Tiamina. El clorhidrato es muy soluble en agua. La solubilidad en alcohol es de 1 g. en 100 cc. de alcohol de 95% o en 315 cc. de alcohol absoluto. Insoluble en cloroformo, benceno, éter y acetona.

Riboflavina. Poco soluble en agua (25 partes en 100.000 a 25°); soluble en alcohol (4,5 mg. 100 cc. a 27° 5 C); también so

luble en alcohol amflicofenol, ciclohexanol, acetato de amilo; in soluble en éter, cloroformo, acetona y benceno. Muy soluble en so luciones alcalinas.

Acido nicotínico. Poco soluble en agua fría; mas en caliente. Insoluble en los disolventes orgánicos. Soluble en alco hol 1,5 %.

Amida nicotínica. Muy soluble en agua, acetona, clo- roformo y butnol. Poco soluble en éter y benceno. Bastante solu- ble en alcohol.

Acido pantoténico. Soluble en agua, acetato de etilo dioxano, ácido acético glacial; un poco en éter y alcohol etílico y amflico; prácticamente insoluble en benceno y cloroformo.

Piridoxina. Soluble en agua, acetona y alcohol; un poco en éter y cloroformo.

Solubilidad, en agua fría: 100 cc. a 26° disuelven
15 gramos.

en alcohol de 95°: 100 cc. a 25° disuel
ven 7,5 gramos.

y en alcohol caliente: 100 cc. a 70° di-
suelven 20 gramos.

Biotina. Fácilmente soluble en agua, metanol y eta- nol diluídos; poco soluble en alcohol; insoluble en éter, cloro- formo y benceno.

Acido para-amino benzoico. Este cuerpo figura entre los constituyentes habituales de la levadura, soluble en agua y muy soluble en alcohol y éter.

Adenina guanina. Poco soluble en alcohol.

No pudiéndose enumerar aisladamente, la solubilidad de los polipéptidos, puede decirse en términos generales que la mayoría de ellos son muy solubles en agua, pero insolubles o muy débilmente solubles en alcohol. Lo mismo puede decirse de los aminoácidos.

2) LAS REACCIONES QUIMICAS

Aunque no hayamos podido practicar, todas las reacciones posibles para conocer la existencia de todas las sustancias que figuran en el cuadro, practicamos las que por su sencillez pudieron ser llevadas a cabo. A continuación se las enumera.

Reacción del biuret: positiva.

Es una reacción común de los tripéptidos y demás polipéptidos superiores, incluyendo las proteínas.

Reacción de Millon: positiva.

En general se usa para identificar la tirosina; la coloración roja se debe a la presencia del grupo fenol en la molécula.

Reacción de Molisch: positiva.

Reacción común a todos los glúcidos, aún para los que están combinados con otras sustancias.

Reacción de Hopkins y Cole: positiva.

Se utiliza para evidenciar la presencia de triptófano.

Reacción de Benedict: negativa.

Sirve para reconocer los glúcidos reductores libres.

Reacción de Nylander: negativa.

Su empleo es semejante al de la reacción anterior.

////

Ya que las reacciones que nos permiten averiguar la presencia de glúcidos en la fracción que estamos analizando han dado un resultado negativo menos en el caso de la reacción de Mollisch que sirve para reconocer los Hidratos de C. que están unidos con otras sustancias, suponemos que se deba a la presencia de ácidos nucleicos, en esa porción del extracto de levadura, o a la de sacáridos no reductores.

3) CRECIMIENTO DEL LACTOBACILLUS CASEI

Como los requerimientos para el crecimiento del L. casei, se conocen perfectamente, se han podido preparar medios sintéticos de composición determinada, para obtener el crecimiento máximo de esa bacteria.

Para la investigación practicada con el L. casei se ensayó un extracto preparado de manera algo diferente a la que se empleó para obtener los primeros extractos que se usaron en este trabajo.

Se adoptó para ello, la eliminación de las primeras fracciones solubles en alcohol, conservando para el estudio las que se obtenían después de 6 extracciones en frío con dicho disolvente.

Este extracto soluble, que es mucho menos coloreado y dá un residuo de aspecto mas cristalino que el que se obtiene con las primeras extracciones en alcohol, reveló las mismas propiedades que los extractos anteriormente usados. Con él se ensayó el crecimiento del L. casei, pues como verosímilmente en su composición haya un número menor de sustancias que en los primeros ex -

tractos y a alguna o algunos de entre ellos se puede atribuir la propiedad inhibitoria del crecimiento de B. cereus en presencia de glucosa, resultará mas simple la investigación de las sustancias que son responsables de la inhibición del cultivo.

Por otra parte, la comparación del crecimiento en este extracto y en la fracción insoluble y en la mezcla de ambas, demostró que el método adoptado era correcto.

Los resultados de la experiencia se consignan en el cuadro siguiente, en el cual a título informativo podemos apreciar el crecimiento de distintos Lactobacillus Delbrückii, obtenidos a partir de un macerado de maíz.

Observando el cuadro siguiente podemos deducir que si bien el desarrollo del L. casei no es abundante en el extracto soluble en alcohol, con glucosa, contiene las sustancias indispensables para su crecimiento; la proporción de éstas no es posible conocerla tan sencillamente y solo diremos que muy verosimilmente deben existir aquellas que constituyen el medio sintético empleado para su crecimiento y que son las siguientes:

Peptona fotolizada (aminoácidos indispensables
o polipéptidos con los aminoácidos indispensables)
l-cistina
d-l-triptófano
glucosa
xilosa
extracto de levadura libre.
de riboflavina.
adenina; guanina; uracilo.
xantina

d-pantotenato de Ca
 ácido nicotínico
 piridoxina
 ácido p-amino benzoico

MICROORGANISMOS	M E D I O S					
	Sol.en alc.(1)	(1)+glu (2)	Ins. alc.(3)	(3)+glu (4)	I+S en alc.(5)	(5)+glu (6)
L. delbrückii (2)	-	+	-	+	±	+
L. delbrückii (4)	-	+	+	++	+	++
L. delbrückii (7)	-	-	-	+++	+	++
L. delbrückii (9)	-	-	±	++	+	++
L. delbrückii (10)	+	+	+	++	+	++
L. casei	+	++	+	++	+	++

En cuanto a los aminoácidos que requiere el L. casei para su crecimiento, según la publicación de B. L. Hutchings and W. H. Peterson fueron determinados en un medio que contenía glucosa, acetato de Na, sales riboflavina, ácidos pantoténicos y nicotínicos, biotina, piridoxina, adenina y ácido fólico. La mezcla mas sencilla de aminoácidos que producía el crecimiento máximo del L. casei contenía: leucina, serina, fenilalanina, ácido glutámico y ácido aspártico, valina, cistina, arginina, triptófano, tirosina, treonina, metionina, alanina, isoleucina, lisina e histidina. En algunos casos se ha observado el crecimiento de este microorganismo con mezclas mas sencillas. Se han encontrado asimismo relacio -

nes antagónicas con algunos de los aminoácidos usados en las experiencias.

CAPITULO XI

TECNICAS USADAS

a) TECNICAS DE COLORACION

Entre las varias técnicas de coloración de Gram existentes, se ha preferido por su sencillez y rapidez, la de Gram Ni colle que se describe a continuación:

Método de Gram-Nicolle (S.A.B. IV 46, pag. 7)

Soluciones:

A. Cristal violeta.....	0,4 g.
alcohol etílico 95%.....	10 cc.
B. Acido fénico.....	1 g.
agua destilada.....	100 cc.
Lugol Iodo.....	1 g.
Ioduro de potasio.....	2 g.
agua destilada.....	200 cc.

Anteriormente, en lugar de 0,4 g. de cristal violeta en 10 cc. de alcohol se usaba 1 g. de dicho colorante en la misma cantidad de alcohol, pero se ha comprobado que existe una tendencia a la gelatinización si la cantidad de colorante es muy grande.

Preparada convenientemente esta solución se conserva por tiempo indefinido.

Procedimiento

Extender en capa delgada una suspensión de bacterias

hecha en una gotita de agua estéril, depositada en la superficie de un portaobjetos. Fijar las bacterias por el calor. Colorear durante 1 minuto con la mezcla de las soluciones A. y B. Escurrir el colorante. Tratar el preparado con la solución de Lugol durante 1 minuto. Lavar con alcohol de 95% por medio minuto. Lavar con agua. Colorear con fucsina en solución acuosa al 1%. Lavar con agua. Examinar con lente de inmersión.

Coloración de esporas.

Muchos son los métodos de coloración de esporas, ensayados hasta el presente. con mayor o menor eficacia, pero el procedimiento usado invariablemente durante el transcurso de este trabajo es el siguiente.

Método de Wirtz modificado por Schaffer-Fulton.

Wirtz (1908) Schaffer y Fulton (1933) (S.A.B. IV 46, pag.13)

Colorantes:

Verde de malaquita en solución acuosa al 5%.

Safranina en solución acuosa al 0,5%.

Procedimiento.

- 1) Extender y fijar las bacterias como siempre.
- 2) Cubrir el preparado con la solución verde de malaquita y calentar hasta vapores tres o cuatro veces, manteniendo el portaobjetos cubierto de colorante.
- 3) Lavar 30 segundos con agua corriente.
- 4) Cubrir el preparado durante 30'' con la solución

de safranina.

5) Lavar con agua corriente

6) Secar y examinar con lente de inmersión.

Resultados.

Las esporas deben teñirse de verde y el resto de la célula de rojo.

A pesar de ser éste el método que ha dado mejores resultados de los varios ensayados, las esporas de algunas bacterias (Bacillus cereus) se muestran reacias a la tinción y para éstas ha sido necesario aumentar el tiempo de contacto con la solución de verde de malaquita hasta 5 minutos. Este inconveniente disminuye a medida que el cultivo envejece.

b) MEDIOS DE CULTIVO

Se describe en éste capítulo el extracto de carne peptonado y el extracto de levadura, pues los medios de cultivo a base de levadura, han sido explicados detalladamente en los capítulos precedentes.

Caldo extracto de carne peptonado.

Extracto de carne.....3 g.

Peptona Parke Davis...5 g.

Agua corriente.....1 lt.

En un litro de agua tibia se disuelven, los ingredientes sólidos y se calienta el todo a ebullición durante 15 minutos. Luego se enfría la solución y se ajusta el pH a 7 con OHNa

N. Se completa el volúmen a 1 lt. se entuba y esteriliza en autoclave a 120° durante 15'.

Si se quiere solidificar este medio, se agrega antes de la filtración agar en un 2%. Se funde esta mezcla en autoclave a 130° durante 15 a 20', se filtra por algodón, se entuba y se esteriliza como en el caso anterior.

Extracto de levadura

Preparación.

Un kilo de levadura de cerveza fresca, se desmenuza en un recipiente adecuado como ser un matraz de 2 litros; se tapa con algodón y se autoliza manteniéndola en la estufa durante 48 horas a 50°. Al cabo de este tiempo, la levadura está flúida; se retira de la estufa. Se mide el volúmen obtenido y se agrega igual cantidad de agua; se ajusta el pH a 7 y se filtra por filtro plegado. El filtrado constituye el extracto de levadura. Se reciben 5 cc. del filtrado en un cristizador tarado que se deja en estufa a 100/110°, hasta constancia de peso para determinar el residuo seco (4 a 6 horas).

El resto del filtrado que constituye el extracto de levadura se esteriliza en autoclave a 120° durante 15 a 20'.

CAPITULO XII

DISCUSION

El fenómeno de la esporulación está gobernado por factores extrínsecos que son por el momento inciertos o desconocidos.

La ausencia de esporas del B. subtilis cultivado en un extracto de levadura, nos condujo a creer que se podría considerar el fenómeno de esporulación como uno de carencia. También cabía la hipótesis de que ciertas sustancias, o su concentración elevada, o la asociación de varias sustancias inhibieran el fenómeno de esporulación. Los intentos de encontrar algún camino fructífero, fueron varios pues el fenómeno no está determinado de manera suficientemente precisa y debimos limitar nuestros esfuerzos a registrar los hechos mas salientes que se observan al cultivar bacterias en el extracto de levadura. Parecería que en presencia de glucosa y cuando las sustancias nutritivas están en la forma original del extracto de levadura, la esporulación del B. subtilis está prácticamente ausente, mientras es precoz y abundante cuando se cultiva esta bacteria en un medio de derivados de la carne. La exuberancia del cultivo y la falta de esporulación parecerían asociados.

En la búsqueda de una interpretación satisfactoria de la no esporulación se encontró el fenómeno de la inhibición del cultivo de varias bacterias esporuladas, en concentraciones altas de extracto de levadura, hecho que tiene el mayor interés si se considera que las bacterias no esporuladas que se ensayaron cultivaron abundantemente y quizás mejor cuando crecía la concentración del extracto de levadura.

Estos fenómenos son mas aparentes y constantes con la fracción soluble en alcohol del extracto.

Estos hechos parecen indicar que las bacterias esporuladas o algunas de ellas por lo menos tienen una forma particular de metabolismo que les fuera común. Además este comportamiento podría ser atribuído a la presencia de sustancias biológicamente muy activas (vitaminas por ej.) que se encuentran en concentración relativamente alta en el extracto de levadura. Esta hipótesis atrayente, hubiera debido ser sometida a la prueba experimental, mas no ha podido serlo por razones circunstanciales.

La complejidad del problema es mayor aún si se consideran los resultados obtenidos con el B. cereus que crece en extracto de levadura de una cierta concentración y no lo hace cuando se agrega glucosa.

Esta inhibición está acompañada de una leve acidificación. Cuando se la neutraliza con un buffer de PO_4H_3 el crecimiento se hace manifiesto. Algunos hechos indican sin embargo que la acidificación solamente no es causa de la inhibición. Otros monosacáridos inhiben también el crecimiento y lo mismo hace el ácido láctico (lactato de Na).

No se ha ensayado la participación que podría tener en esos fenómenos la presencia y la concentración de los iones PO_4 . Es natural que el fenómeno se suponga vinculado al metabolismo de la glucosa y por lo tanto se lo debiera explorar a la luz de los conocimientos de las transformaciones de este cuerpo.

Un ensayo hecho con la adición de un medio sintético, en el que crece el B. cereus, al extracto de levadura, pareció indicar que el fenómeno es mas complejo aún, pues predominó el com-

portamiento del extracto de levadura de glucosa, sobre el del medio sintético (que contiene P04).

Es obvio que las diferencias tan marcadas del B.cereus y otras bacterias en distintos medios de cultivo pueden servir de punto de partida a la investigación de la existencia de distintos caminos de metabolismo o de diferentes sistemas enzimáticos que se pueden poner de manifiesto cuando se usa el medio apropiado. Basta con imaginar que en éste pueden encontrarse coenzimas o precursores de cuerpos o los cuerpos mismos que son esenciales para un cierto sistema que es dominante en el metabolismo, o que existen sustancias inhibitoras de otro cierto camino de metabolismo, para ver cuantas posibilidades encierran los hechos experimentales expuestos.

CAPITULO XIII

RESUMEN Y CONCLUSIONES

- 1) La esporulación del B. subtilis es demorada y substancialmente disminuída por el cultivo en un medio de autolizado de levadura en presencia de glucosa. En ese medio el desarrollo es exhuberante y presenta características muy peculiares.
- 2) Esta propiedad retartadriz está contenida en la fracción soluble en alcohol.
- 3) Cuando la concentración de las materias sólidas de la fracción soluble en alcohol del autolizado de levadura es alta (2,4% - 1,2%) el cultivo del B. cereus se inhibe, mientras que con concentraciones menores esa bacteria crece. Con otras bacterias esporuladas el fenómeno es menos aparente y no se observa con bacterias no esporuladas.
- 4) La adición de glucosa al medio constituido por la fracción soluble en alcohol inhibe el crecimiento del B. cereus así como de varias otras bacterias esporuladas aún con concentraciones bajas de extracto capaces de mantener el crecimiento en ausencia de glucosa. La inhibición es mayor con mayores concentraciones de glucosa.
- 5) Acción semejante a la de la glucosa se observa con otros monosacáridos y con el ácido láctico (lactato de Na).
- 6) El crecimiento del B. cereus en un medio sintético puede ser inhibido por la adición de la fracción soluble en alcohol del extracto en presencia de glucosa.
- 7) No se ha podido encontrar explicación satisfactoria de la inhibición del cultivo. Se exponen hechos análogos contenidos en la

literatura.

- 8) A título informativo se trata de la posible constitución del extracto de levadura y de la fracción soluble en alcohol.

Adicional

INDICE

Capítulo I.	Antecedentes bibliográficos.....Pag. 1
Capítulo II.	Objeto del presente estudio.....Pag. 6
Capítulo III.	El comportamiento de varias especies de bacterias esporuladas en el medio de levadura.....Pag. 8
Capítulo IV.	Estudio del crecimiento y esporulación del <u>Bacillus subtilis</u> en medios sólidos y líquidos a base de levadura.....Pag.10
Capítulo V.	Fraccionamiento del extracto de levadura. Comportamiento del <u>B. subtilis</u> y <u>B. cereus</u> en las distintas fracciones.....Pag.16
Capítulo VI.	Comparación del cultivo de bacterias esporuladas y no esporuladas en medios a base de extracto de levadura.....Pag.27
Capítulo VII.	Influencia de distintos azúcares y otras sustancias en el crecimiento de las bacterias esporuladas.....Pag.31
Capítulo VIII.	Importancia de la edad del cultivo en los fenómenos observados.....Pag.37
Capítulo IX.	El fenómeno de inhibición del cultivo.a)Literatura,b)Parte experimental....Pag.39
Capítulo X.	Consideraciones sobre la posible constitución del medio. 1) Solubilidad de las sustancias. 2) Reacciones químicas. 3) Crecimiento del <u>Lactobacillus casei</u>Pag.48
Capítulo XI.	Técnicas usadas.a) de coloración b) medios de cultivo.....Pag.58
Capítulo XII.	Discusión.....Pag.62
Capítulo XIII.	Resumen y conclusiones.....Pag.65

BIBLIOGRAFIA

- APPLEBY, J. C. 1939 Some variations in morphology of a spore forming bacillus. J. Bact., 38, 653-658.
- BAYNE-JONES, S. y PETRILLI A. 1933 Cypological changes during the formation of the endospore in Bacillus megatherium. J. Bact., 25, 261-276.
- BARTON, E. y WRIGHT 1945 Practical methods for the microbiological analysis of the vitamin B complex. Analyst 70, 283.
- BEERSTECHEER, E. Jr., y SHIVE W. 1947 Tryptophan as a competitive growth inhibiting factor analog of phenylalanine. J. Amer. Soc. 69, 461-462.
- BOZEMANN, S. R. y ORCUTT, F. S. 1945 Glucose utilization compared with pH produced when influenced by concurrent decomposition of peptone by the genus Bacillus. J. Bact., 49, 108-109.
- BRUNSTETTER, B. C. y MAGOON, C. A. 1932 Studies on bacterial spores. III. A contribution to the physiology of spore production in Bacillus Mycoides. J. Bact., 24, 85-122.
- CONKLIN, M. E. 1934 Mercurochrome as a bacteriological strain. J. Bact., 27, 30.
- COOK, R. P. 1931 Some factors influencing spore formation in Bacillus subtilis and the metabolism of its spores. Zentr. Bakt. Parasitenk., I, Orig., 122, 329-335.
- DORNER, W. C. 1922 Un procédé simple pour la coloration des spores. Le lait, 6, 8-12.
- FABIAN, F. W. y BRYAN, C. S. 1933 The influence of cations on aerobic sporogenesis in a liquid medium. J. Bact. 26

543-558.

- GREENE? H. C. 1938 Colony organization of certain bacteria with reference to sporulation. J. Bact., 35, 261-274.
- HAYWARD, A. E. 1943 Some physiological factors in spore production. J. Bact., 45, 200.
- HAYWARD, A. E., MARCHETTA, J. A. y HUTTON 1946 Strain variation as a factor in the sporulating properties of the so-called "Bacillus globigii" J. Bact., 52, 51-54.
- HUTCHINGS, B. L. y PETERSON, W. H. 1943 Amino acids requirements of L. casei. Proc. Soc. Expl. Biol. Med. 52, 36-38.
- KATZNELSON y LOCHHEAD, G. 1947 Nutritional requirements of Bacillus alvei and Bacillus para-alvei. J. Bact. 53, 83-88.
- KNAYSI, G. 1945 A study of some environmental factors which control endospores formation of Bacillus Mycoides. J. Bact., 49, 473-493.
- KNAYSI, G. 1945 Investigation of the existence and nature of reserve material in the endospore of a strain of Bacillus Mycoides by an indirect method. J. Bact., 49, 617-622.
- KNAYSI, G. 1945 On the origins and fate of the fatty inclusions in a strain of Bacillus cereus. Science 102, 424.
- KNAYSI, G. 1946 On the process of sporulation in a strain of Bacillus cereus. J. Bact., 51, 187-197.
- KNAYSI, G. 1947 A study, with the high-voltage electron microscope, of the endospore and life cycle of Bacillus Mycoides. J. Bact., 53, 525-5237.
- KNAYSI, G. y BAKER, R. F. 1947 Demonstration, with the electron

- microscope of a nucleous in *Bacillus Mycoides* grown in a nitrogen-free medium. *J. Bact.*, 53, 39-53.
- KNIGHT, B. C. J. C. 1945 Groth factors on Microbiology. *Vitamins and Hormones* 3, 105-228.
- KOSER, S. A. y BAIRD, G. R. 1944 Bacterial destruction of nicotinic acid. *J. Infectious diseases* 75, 250-261.
- KOSER, S. A. y KASAI, G. 1947 The effect of large amounts of nicotinic acid and nicotinamide on bacterial growth. *J. Bact.*, 53, 743-753.
- LAMANNA, C. 1940 The taxonomy of the henus *Bacillus*. I. Modes of spore germination. *J. Bact.*, 40, 347-360.
- LEWIS, I. M. 1934 Cell inclusions and endospore formation in *B. Mycoides*. *J. Bact.*, 28, 133-144.
- LOCHHEAD, G. 1946 Nutritional requirements of *Bacillus* larvae. *J. Bact.*, 44, 185-189.
- MIGULA, M. 1904 Allgemeine Morphologie, Entwicklungsgeschichte, Anatomie und Systematik der Schizomyceten. In Lafar's *Handb. techn. Myko.* 1, 29-149.
- MONOD, J. 1942 Sur un phenomene de lyse du a l'inanition carbonée. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)* 68, 444-451.
- PETERSON, W. H. y PETERSON M. S. 1945 Relations of bacteria to vitamins and others growth factors. *Bact. Rev.* 9, 49-109.
- ROBERTS, J. L. 1934 Endospore formation by *Bacillus subtilis* in a synthetic medium. *Science, N. S.* 79, 432-433.
- ROBERTS, J. L. y BALDWIN, I. L. 1942 Spore formation by *Bacillus subtilis* in peptone solutions altered by treatment

- with activated charcoal. J. Bact., 44, 653-659.
- SCHREIBER, O. 1896 Ueber die physiologischen Bedingungen der engen Sporenbildung bei Bacillus anthracis, subtilis und tumescens. Zentr. Bakt. Parasitenk. I. 20, 253-374.
- SNELL y SHINE 1945 Growth inhibition by analogues of pantothenic acid. Pantothenic alcohol and related compounds. J. Biol. Chem. 158, 551-559.
- STRANDSKOV, F. y WYSS, O. 1946 The inhibition of bacteria by thio-pyrimidines. J. Bact., 52, 575-579.
- WILLIAMS, O. B. 1929 The heat resistance of bacterial spores. J. Infectious Diseases. 44, 421-465.
- WILLIAMS, O. B. 1930-1931 Bacterial endospore formation in media of varying biologic value. Proc.Soc.Expl.Biol.Med. 28, 615-617.
- WIRTZ, R. 1908 Ein einfache Art der Sporenfärbung. Zentr.Bakt. I. Abt.Orig. 46, 727-728.

